

**DERWENT-** 1993-298027

**ACC-NO:**

**DERWENT-** 199338

**WEEK:**

**COPYRIGHT 2006 DERWENT INFORMATION LTD**

**TITLE:** Bleaching pulp without using chlorine@ or chlorine contg. cpds. - by treating pulp with prod. from culture of Bacillus licheniformis or enzymes contg. hemicellulase to dissolve lignin

**PATENT-ASSIGNEE:** SHOWA DENKO KK[SHOW]

**PRIORITY-DATA:** 1992JP-0013868 (January 29, 1992)

**PATENT-FAMILY:**

<b>PUB-NO</b>	<b>PUB-DATE</b>	<b>LANGUAGE</b>	<b>PAGES</b>	<b>MAIN-IPC</b>
JP 05209385 A	August 20, 1993	N/A	006	D21C 009/10

**APPLICATION-DATA:**

<b>PUB-NO</b>	<b>APPL-DESCRIPTOR</b>	<b>APPL-NO</b>	<b>APPL-DATE</b>
JP 05209385A	N/A	1992JP-0013868	January 29, 1992

**INT-CL (IPC):** D21C009/10

**ABSTRACTED-PUB-NO:** JP 05209385A

**BASIC-ABSTRACT:**

Pulp is treated with a prod. from culture of Bacillus licheniformis (BL) or enzymes from BL contg. at least one hemicellulase, to dissolve lignin in the pulp. The dissolved lignin is removed from the pulp.

Pref. the prod. from culture of BL is supernatant liq. of BL culture. The BL is SD516 or its variant.

USE/ADVANTAGE - The process reduces the amt. of corrosive waste water as Cl2 or Cl-contg. cpds. are not used

**CHOSEN-** Dwg.0/00

**DRAWING:**

**TITLE-TERMS:** BLEACH PULP CHLORINE@ CHLORINE CONTAIN COMPOUND TREAT PULP PRODUCT CULTURE BACILLUS LICHENIFORMIS ENZYME CONTAIN HEMICELLULASE DISSOLVE LIGNIN

**DERWENT-CLASS:** D16 F09

**CPI-CODES:** D05-A01B3; F05-A02B;

**SECONDARY-ACC-NO:**

**CPI Secondary Accession Numbers:** C1993-132271

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-209385

(43)公開日 平成5年(1993)8月20日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
D 21 C 9/10

識別記号  
Z 7199-3B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3(全6頁)

(21)出願番号 特願平4-13868

(22)出願日 平成4年(1992)1月29日

(71)出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(72)発明者 植木 和子

東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和  
電工株式会社生化学研究所内

(72)発明者 蒲池 元昭

東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和  
電工株式会社生化学研究所内

(72)発明者 愛知後 貴

東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和  
電工株式会社生化学研究所内

(74)代理人 弁理士 寺田 實

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 パルプの漂白方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】環境保全の見地より化学薬品ではなく酵素の使用によりパルプのリグニン全量を短時間で効果的に低下させる。

【構成】バチルス リケニフォルミスの培養物又はバチルス リケニフォルミスの少なくとも1種類のヘミセルラーゼを含む酵素により従来法にはなく比較的短時間でパルプ中のリグニン含有物を効果的に溶解し、その溶解したリグニンを有為なほどの粘度低下つまりセルロース繊維の劣化をまねくことなくパルプから除去することを特徴とするパルプの漂白方法。

RECEIVED

AM/PM

JUL 03 2006

VOLPE & KOENIG, P.C.

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 パルプを漂白するための方法であって、バチルス リケニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)の培養物又はバチルス リケニフォルミスの少なくとも1種類のヘミセルラーゼを含む酵素によりパルプを処理することによってパルプのリグニン含有物を溶解し、その溶解したリグニンをパルプから除去することを特徴とする方法。

【請求項2】 ヘミセルラーゼがキシラナーゼである請求項1記載の方法。

【請求項3】 バチルス リケニフォルミスがSD516あるいはその変異株である請求項1記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、パルプのリグニン含有量を低めるために、バチルス リケニフォルミス由來の酵素の使用に関する。

## 【0002】

【従来の技術】現在、大部分のパルプは木材からつくられている。その木材は、主成分としてセルロース、ヘミセルロース及びリグニンからなり、それぞれ約35～50%、20～30%、20～30%を含有している。このうち、ヘミセルロースはセルロース分子と纖維束との架橋結合に関与し、リグニンはセルロース纖維を取り囲みこれを束ねることにより強度と剛性を与えていたといわれている。紙製造工程において、このリグニンは木材成分から除かれるべきものである。なぜなら、それは紙の強度を減じ、またかっ色を与えるなど望まれない性質を紙に与えてしまうからである。

【0003】一般に、木材チップは硫化ナトリウムと水酸化ナトリウムにより処理されるクラフト法と呼ばれる工程でパルプ化される。この工程で大部分のリグニンは分解されるが、一部残留リグニンとしてパルプ中に留まってしまう。例えばクラフトパルプ中には残留リグニンが約4～12重量%が含まれている。

【0004】この様な残留リグニン量を更に減少させるためには、パルプは漂白と言われる化学処理が行われる。現在最も一般的に用いられるパルプ漂白剤は、塩素又は次亜塩素酸塩（次亜塩素酸ナトリウムや次亜塩素酸カリウム）、二酸化塩素などの塩素含有化合物である。これらの漂白剤を用いた漂白工程の欠点として、この工程からきわめて腐食性で大量の塩素化されたリグニン分解物を含有した排水がでることである。これらの塩素化有機物は有毒でありかつ突然変異誘発性および発ガン性が高いと言われている。従って、この排水の処置は深刻な廃棄物処理上の問題となっている。また、この排水中の高腐食性塩素化合物は工場機械を腐食するため、この排水を他の製紙工程に循環して使用することもできない。これらの理由から漂白に必要な塩素を減少する代替漂白法が産業界で熱望されている。

2

【0005】また最近、塩素系化合物の代替漂白剤として過酸化水素、酸素、オゾンも使用されてきている。しかし、これらの化合物も単独ではいろいろな欠点をいまだ伴っている。例えば、過酸化水素による漂白において塩素系化合物と同程度の脱リグニンをクラフトパルプでおこなうとするとセルロース纖維は許容量以上の劣化を受ける。酸素やオゾンによる漂白でもセルロース纖維の劣化が生じやすい。このようなセルロース纖維の劣化は、パルプ收率を低下させるとともにパルプの粘度低下による機械的に弱い性質を持つ紙をつくる原因になってしまう。

【0006】以上述べてきたような従来からあるパルプ漂白剤の欠点を克服するために、酵素等による非汚染的な生物学的漂白方法が現在開発されてきている。例えば、白色枯葉菌であるファネロケーテ クリソスピロウム(*Phanerochaete chrysosporium*)を用いて直接リグニンを分解するパルプ漂白法がある(*Appl. Microbiol Bio technol.*, 25, 484, 1987)。しかしながら、このような菌を用いた漂白は脱リグニンがきわめて遅く、満足すべき白色度（パルプや紙の白さの程度あらわす値、JIS 7074及びJIS P8123に示してある）やカッパー価（パルプ中のリグニン含量に近似する値、JIS P8211に示されている）を得るためにには少なくとも3～7日を要する。

【0007】一方リグニンがヘミセルロースに結合しているという点から、キシラナーゼをパルプの脱リグニンに使うという報告もいくつかある。例えば、Viikari ら(Proceedings of the International Symposium on Wood And Pulping Chemistry, Paris, 1987) やPaice ら(Biotech. and Bioeng., 32, 235, 1988) の報告、あるいは特開平2-264087、特開平3-40887、W091/02839、W091/02840等である。しかしながら、いずれの方法においてもパルプ中のリグニンを効果的に取り除くためには3～24時間という比較的長時間の酵素処理が必要であり、現在の漂白行程にかけられる時間から考えるとまだ満足のいくものとはいえない。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、バチルス リケニフォルミスの培養物又はバチルス リケニフォルミスの少なくとも1種類のヘミセルラーゼを含む酵素により従来法ではなく比較的短時間でパルプ中のリグニン含有物を効果的に溶解し、その溶解したリグニンを有為なほど粘度低下つまりセルロース纖維の劣化をまねくことなくパルプから除去することを特徴とするパルプの漂白方法を提供することにある。

【0009】また、塩素含有漂白剤を慣用されている使用量よりも減少することにより、従来の塩素漂白段階に伴って生じる腐食性の汚染排水を可能な限り減少させることができ、環境上からみても一層受け入れられる漂白方法を提供することにある。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、バチルス・リケニフォルミス由来の酵素あるいは培養物でパルプを処理することにより従来の酵素処理方法と比べて短時間にかつ効果的に脱リグニンできることを意外にも発見した。

【0011】バチルス・リケニフォルミス株は、パルプを処理するための酵素を供給源として本発明に使用される。しかしながら、好ましい株は比較的多量のヘミセルラーゼを産生する株である。一方、パルプを処理するために好ましいヘミセルラーゼはキシラナーゼであり、より好ましくはエンドキシラナーゼである。

【0012】多量のキシラナーゼを産生するバチルス・リケニフォルミスの株は、例えばSD516であり、これは工業技術院微生物工業研究所に寄託してある（微研菌寄第10427号）。

【0013】パルプ処理のための酵素供給源としては、バチルス・リケニフォルミスの菌体を有さない酵素調製物、例えば精製された酵素または菌体培養液の粗抽出物である。好ましくは、バチルス・リケニフォルミスの培養物から得られる上清液である。より好ましくは、使用前に限外済過膜等の装置で適当な濃度に濃縮されるが、そこには実質的にセルラーゼ活性は有していない。従って、パルプ中のセルロースには損傷を与えることはない。

【0014】バチルス・リケニフォルミスの上清液は、菌体によるヘミセルラーゼの産生を誘導するための適切な炭素源存在下で増殖するバチルス・リケニフォルミスの培養物から得られる。好ましくは、キシラン、フスマ（大部分は小麦由来）、機械及び化学パルプ、木材チップ等である。より好ましくは、フスマまたは広葉樹クラフトパルプである。

【0015】本発明の方法に使用するためには、最適酵素産生が達成される場合、例えばバチルス・リケニフォルミスの12～72時間の培養液上清液が好ましい。一般には、酵素濃度は、0.1～1000キシラナーゼ単位/g乾燥パルプ(U/g)、好ましくは10～200U/gの範囲である。1キシラナーゼ単位は、50℃で1分当たり、バーチウッドキシランから産生される1μモルのキシロースに相当する。

【0016】本発明の方法のように直接酵素をパルプに作用させる場合、好ましくは酵素活性を増強する温度、pH、時間で行われることが望ましい。すなわち、酵素処理温度は約10～約80℃、より好ましく40～60℃で行われる。酵素処理pHは、好ましくは3～8、より好ましくは5～7の範囲である。一方、パルプに酵素を作用させ良好な結果を得るための時間としては、1～24時間、より好ましくは1～3時間である。

【0017】例えば、実施例に示したように本発明に用いるバチルス・リケニフォルミス由来のキシラナーゼ

10

20

30

30

40

40

50

0.0U/g パルプで広葉樹未漂白クラフトパルプの酵素処理を行うと、わずか1時間という短時間の酵素処理で除かれるべきリグニンの大部分が除去される。また、針葉樹未漂白クラフトパルプにおいてもわずか1時間の酵素処理により同様な効果が得られることが示された。これらの結果は従来から示されている方法ではなく、現在行われている塩素系化学漂白剤を用いた漂白工程の一部として十分に利用可能な処理時間だと考えられる。また、本発明の方法に用いるバチルス・リケニフォルミス由来のヘミセルラーゼでパルプの酵素処理を3時間以上で行うこともできるが、実施例にも示してあるようにわずかなカッパー価の減少が認められるだけで総合的なメリットはほとんど期待できない。

【0018】本発明の方法は、広範囲のパルプに適用され、パルプ中の残留リグニン量を減少することができる。例えば、碎木パルプ、亜硫酸パルプ、セミケミカルパルプ、リファイナーグランドパルプ、クラフトパルプなどである。

【0019】バチルス・リケニフォルミスの培養物又はそれ由来の酵素を用いた処理に統いて、パルプから溶解されたリグニンの除去が抽出によって行われる。例えば、水酸化ナトリウム抽出が一般には行われる。典型的な抽出条件は、1～5%濃度の水酸化ナトリウムで40～80℃の温度で3～20%のパルプ濃度で行われる。滞留時間は30分～3時間、好ましくは1～2時間である。

【0020】より効果的にパルプの白色度を向上させるためには、本発明の方法による処理のち、化学漂白剤等を使用することが望ましい。しかしながら、その使用量はパルプを化学漂白剤のみで漂白するときより有意に減じることができる。例えば、二酸化塩素を化学漂白剤として使用した場合、その使用量を少なくとも20%より好ましくは少なくとも40%減じることができる。

【0021】バチルス・リケニフォルミスの培養物又はその酵素によって処理されたパルプから製造された紙は従来の漂白パルプから製造された紙よりも増強された品質を有することも見いだされた。これは、パルプ中のヘミセルロース成分の1つであるキシランがキシラナーゼ処理により効果的に除去されたためと考えられるが、詳細はよく知らない。

【0022】次に、バチルス・リケニフォルミス SD516のキシラナーゼ産生を高めた変異株を効率よく取得する方法について述べる。その方法としては、大別して以下の方法をあげることができる。1つは、突然変異剤を用いて人工突然変異株を得る方法であり、その他として遺伝子操作によって遺伝子組換え微生物を得る方法である。

【0023】例えば、突然変異剤による方法では、突然変異を誘発する変異源としてN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)等のアルキル化

5

剤、5-ブロモウラシル等の塩基類縁化合物、アザセリン等の塩基合成阻害剤、アクリジンオレンジ等の色素類あるいは紫外線(UV)などを用いることができる。このうちUV照射による突然変異体の取得は、その突然変異誘発機構が詳細に研究されていることから広く一般に用いられている。この方法により、バチルスリケニフォルミスSD516のキシラナーゼ高生産突然変異株を容易に得ることができる。つまり、キシランを加えた寒天平板培地上で生育してきたコロニー(菌の集落)のまわりにできるハロー(菌の周辺部のキシランの濁りがキシラナーゼにより分解され淡くなっている状態)の大きさによりキシラナーゼ産生の高い株を分離することができる。

【0024】また、キシラナーゼの産生をより増大させるために及び/又はより一層純粋なキシラナーゼを製造するための菌株として、遺伝子操作により製造された微生物、即ち組換え体微生物を用いることもできる。組換え体微生物はバチルス属の変異株を宿主として用い、この宿主細胞にハイブリドプラスミドを導入することによって作製しうるものである。例えば、前記の宿主として用いるバチルスリケニフォルミスの変異株は、NTGを用いて突然変異を誘発させたものであり、セルラーゼ生産活性をもたずかつキシラナーゼ生産活性を持たない2重的な変異株であることが好ましい。この2重的な変異株は、主な炭素源として1%カルボキシメチルセルロースあるいはキシランを含む最小寒天平板培地上で菌のまわりにハローが存在しないことにより容易に選抜することができる。

【0025】また、前記ハイブリドプラスミドとはキシラナーゼ遺伝子を適当なプラスミドに組み込むことによって構築されたプラスミドであり、例えば制限酵素BamHIで切断したベクタープラスミドpUB110と制限酵素Sau3AIで部分分解したバチルスリケニフォルミスSD516由来の染色体DNA断片から得られたキシラナーゼ遺伝子とをT4DNAリガーゼ等の連結反応(ligation)により構築されたものである。

【0026】前記ハイブリドプラスミドはプロトプラストの融合あるいは形質導入あるいは形質転換などの手法により宿主微生物に導入することができる。また、ハイブリドプラスミドが組み込まれた宿主微生物はセルラーゼを含まないキシラナーゼを細胞外に分泌することができる。このため、キシラナーゼ生産活性のある組換え体微生物の選別は、0.5%キシランを含んだ寒天培地上に生育したコロニーのまわりに出来るハローの有無によ \*

酵素反応時間	カッパー値
0時間	21.8
1	18.6
3	17.5
24	17.2

また、酵素処理24時間後の乾燥パルプ重量は2.8g※50※であった。

6

\*って容易に行うことが出来る。

#### 【0027】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに説明するが、これらのみに限定されるものではない。

実施例1 バチルスリケニフォルミスSD516の培養液から得られる上清液を用いての広葉樹未漂白クラフトパルプの漂白

乾燥した広葉樹未漂白クラフトパルプ3gをイオン交換水100mlに懸濁、離解する。バチルスリケニフォルミスの培養液より調製された酵素をキシラナーゼ活性として200U/gパルプとなるようにパルプスラリーに添加する。なお酵素反応pHは6に調製した。このパルプスラリーを50°Cで1時間、3時間または24時間インキュベートし、ついでパルプを戻過後、数倍量のイオン交換水で洗浄する。つづいて2%(W/V)のNaOHにより60°Cで1時間抽出し、脱イオン水で洗浄し中性pHにする。酵素無添加サンプルを調製することにより酵素処理の効果を比較する。各処理でのパルプのカッパー値は下記に示した。なお、カッパー値の測定はJISP82

20 11の方法に従って行った。

酵素処理時間	カッパー値
0時間	12.5
1	9.5
3	8.8
24	8.2

また、酵素処理24時間後の乾燥パルプ重量は2.8gであった。

【0028】実施例2 バチルスリケニフォルミスSD516の培養液から得られる上清液を用いての針葉樹未漂白クラフトパルプの漂白

乾燥した針葉樹未漂白クラフトパルプ3gをイオン交換水100mlに懸濁、離解する。バチルスリケニフォルミスの培養液より調製された酵素をキシラナーゼ活性として200U/gパルプとなるようにパルプスラリーに添加する。なお酵素反応pHは6に調製した。このパルプスラリーを50°Cで1時間、3時間または24時間インキュベートし、ついでパルプを戻過後、数倍量のイオン交換水で洗浄する。つづいて2%(W/V)のNaOHにより60°Cで1時間抽出し、脱イオン水で洗浄し中性pHにする。酵素無添加サンプルを調製することにより酵素処理の効果を比較した。各処理でのパルプのカッパー値は下記に示した。

40

7

【0029】実施例3 バチルス リケニフォルミス SD516の培養液から得られる上清液を用いての広葉樹未漂白クラフトバルプの漂白

乾燥した広葉樹未漂白クラフトバルプ3gをイオン交換水100mlに懸濁、離解する。続いて、バチルス リケニフォルミスの培養液より調製された酵素をキシラナーゼ活性として10、30、60、120、200、300U/gバルプとなるようにバルプスラリーに添加する。なお酵素反応pHは6に調製した。このバルプスラリーを50°Cで3時間インキュベートし、ついでバルプを沪過後、数倍量のイオン交換水で洗浄する。つづいて2% (W/V) のNaOHにより60°Cで1時間抽出し、脱イオン水で洗浄し中性pHにする。酵素無添加サンプルを調製することにより酵素処理の効果を比較した。各処理でのバルプのカッパー価は下記に示した。

酵素添加量(U/g)	カッパー価
0	12.4
10	10.1
30	9.9
60	9.6
120	9.3
200	8.8
300	8.7

【0030】実施例4 バチルス リケニフォルミス SD516の培養上清液を用いて広葉樹未漂白クラフトバルプの脱リグニンを行ったのち二酸化塩素による漂白

乾燥した広葉樹未漂白クラフトバルプ3gをイオン交換水100mlに懸濁、離解する。続いて、バチルス リケニフォルミスの培養液より調製された酵素をキシラナーゼ活性として200U/gバルプとなるようにバルプスラリーに添加する。なお酵素反応pHは6に調製した。このバルプスラリーを50°Cで3時間インキュベートし沪過後、数倍量のイオン交換水で洗浄する。続いて、バルプ濃度を3%とし、二酸化塩素を乾燥バルプ重量に対し有効塩素量が0~2.0%となるように添加し、60°Cで3時間漂白処理した。処理後沪過水洗し、バルプ濃度が3%となるようにイオン交換水を加えた。つづいて2% (W/V) のNaOHにより60°Cで1時間抽出し、脱イオン水で洗浄し中性pHにする。二酸化塩素処理だけのサンプルを調製することにより酵素処理の効果を比較した。各処理でのバルプのカッパー価は下記に示した。

有効塩素量(%)	酵素+二酸化塩素	二酸化塩素
0	8.8	11.6
1.0	5.1	8.6
1.5	3.0	5.6
2.0	2.2	3.3

【0031】実施例5 バチルス リケニフォルミス SD516からのキシラナーゼ高生産突然変異株の取

8

得

L培地(0.5%酵母エキス、0.1%ポリペプトン、0.5%NaCl、pH7.5)で生育させたバチルス リケニフォルミス SD516の菌体を遠心分離により回収し、生理食塩水で数回洗浄する。その洗浄菌体を再度生理食塩水に懸濁後、菌の死滅率が9.9%以上となるようにUVを照射する。そのUV照射液を適当に希釈した後、L培地にキシラン0.5%を加えた寒天平板培地上に塗布する。35°Cで培養後、生育してきたコロニーのまわりのハローの大きさによりキシラナーゼ産生の高い株を分離した。得られた変異株は、L培地の寒天平板培地上で35°Cにて培養後、4°Cで保存した。

【0032】変異株のキシラナーゼ生産性は、以下のような方法で親株と比較した。つまり、L培地にキシラン源(例えば7%小麦フスマまたは1%キシラン)を含有する培地2L(pH7.5)を5L容ジャーファメンターに入れ、121°C、30分殺菌した。変異株を種菌後、35°Cでキシラナーゼ活性がピークとなるまで(通常1~2日)激しくかくはん(通常800~1000rpm)して培養した。なお、通気量は1~2L/分の条件下で行った。キシラナーゼ活性がピークに達した後、微生物細胞と他の固体物は従来の方法、例えば沪過とか遠心分離によって除去し、清澄な炉液あるいは上清液を得た。このようにして得られた粗酵素液のキシラナーゼ活性は、7%小麦フスマをキシラン源として用いたとき約10U/mlであった。この値は、親株であるSD516を同様に培養したときのキシラナーゼ活性の約1.5倍上昇している値であった。

【0033】

【発明の効果】本発明の方法によれば、比較的短時間でバルプ中のリグニン含有物を効果的に溶解し、その溶解したリグニンを有為なほどの粘度低下つまりセルロース繊維の劣化をまねくことなくバルプから除去することが出来る。また、塩素含有漂白剤を慣用されている使用量よりも減少することにより、従来の塩素漂白段階に伴って生じる腐食性の汚染排水を可能な限り減少させることができ、環境上からみても一層受け入れられる漂白方法が提供される。

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 楠口 能孝  
東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和  
電工株式会社生化学研究所内